

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ – СКОПЈЕ

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИНСТИТУТ ЗА ХЕМИЈА

М-р Даринка Ѓоргиева Ацкова

**ИСПИТУВАЊЕ НА ТЕРАПЕВТСКИ РАДИОФАРМАЦЕВТИЦИ
БАЗИРАНИ НА МОНОКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА И ПЕПТИДИ**

докторска дисертација

Скопје, 2015

ИСПИТУВАЊЕ НА ТЕРАПЕВТСКИ РАДИОФАРМАЦЕВТИЦИ БАЗИРАНИ НА МОНОКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА И ПЕПТИДИ

АПСТРАКТ

Рекомбинантните моноклонални антитела и пептиди во моментот се оценети како значајна и растечка класа на лекови со биолошко потекло. Имајќи ја предвид употребата на радиоимуноконјугати за терапија на не-Хочкинов лимфом (NHL), во рамките на овој труд направено е испитување на ново подготвена лиофилизирана формулација, обележана со нерадиоактивни (Lu и Y) или радиоактивни изотопи (^{177}Lu), на три различни конјугати на ритуксимаб со бифункционален хелатирачки агенс (BFCA), за проценка и потврдување на структурата. Беа користени три типа BFCA, *p*-Bn-SCN-DOTA, *p*-Bn-SCN-DTPA и 1B4M-DTPA. Од резултатите добиени со SDS-PAGE потврдено е дека чекорите на конјугација и процесот на лиофилизација, како и обележувањето на имуноконјугатите со Lu и Y е успешно, без да предизвика значајни промени во молекулите на имуноконјугатите и без формирање на споредни производи (фрагментирање на антителото и/или присуство на агрегати). Карактеризацијата на конјугатите и утврдувањето на просечниот број на молекули на BFCA прикачени на секоја молекула од антителото беше направена со MALDI-TOF MS при што беше утврдено просечно врзување на 6,1 (DOTA), 8,8 (DTPA) и 8,3 (1B4M-DTPA) молекули за антителото. За потврда на задржување на секундарната структура на антителото и можните модификации после обележување, беше извршено испитување со вибрациона спектроскопија на конјугатите обележани со нерадиоактивните изотопи. Врз основа на добиените фреквенции за амидните ленти I, II и III, беше утврдено дека компонентите од интерес во ова испитување содржат највисок процент β -конформација (антипаралелна и паралелна) во структурата, проследено со α -хеликс. Утврдени се одредени поместувања во снимените спектри на неколку од карактеристичните ленти на ритуксимаб, во зависност од присуството на хелатор и метал за врзување, што се во врска со формираните комплекси. Добиените радиоимуноконјугати (обележани со 555 GBq/mg ^{177}Lu) беа дополнително карактеризирани со ITLC и SE-HPLC, при што покажаа висок степен на радиохемиска чистота со површина под пикот на имуноконјугатот повеќе од 95% од вкупната површина. Хемиското и биолошкото карактеризирање на новодобиените имуноконјугати во *in vitro* и *in vivo* услови за определување на параметрите важни за последователно радиообележување, поставија основа за понатамошно квалификување на препаратот за предклинички и клинички студии за дијагностика/терапија на лимфоми.

Клучни зборови: ритуксимаб, *p*-Bn-SCN-DOTA, *p*-Bn-SCN-DTPA, 1B4M-DTPA, лутециум, итриум

Darinka Gjorgieva Ackova

INVESTIGATIONS OF MONOCLONAL ANTIBODIES AND PEPTIDES BASED THERAPEUTIC RADIOPHARMACEUTICALS

ABSTRACT

Recombinant monoclonal antibodies and peptides are currently rated as a significant and growing class of drugs with biological origin. According to the usage of the radioimmunoconjugates in therapy of non-Hodgkin's Lymphoma (NHL), we made investigations to newly prepared lyophilized formulations labeled with non-radioactive (Lu and Y) or radioactive isotopes (^{177}Lu), of three different rituximab-bifunctional chelating agents (BFCA) conjugates, for assessment and evaluation of the structure. Three types of BFCA, *p*-Bn-SCN-DOTA, *p*-Bn-SCN-DTPA and 1B4M-DTPA were used. The results obtained by SDS-PAGE confirmed that conjugation and lyophilization steps and labeling of immunoconjugates with Lu and Y is successful, without significant changes in the molecules and forming of by-products (fragmentation of the antibody and/or presence of aggregates). Characterization of conjugates and determination of the average number of molecules of BFCA attached to each molecule of the antibody was made by MALDI-TOF MS where binding of an average 6.1 (DOTA), 8.8 (DTPA) and 8.3 (1B4M-DTPA) molecules per antibody were determined. Confirmation of the retention of secondary structure and possible modifications of the antibody after labeling, was carried out by means of vibrational spectroscopy. Based on the obtained frequencies for amide I, II and III bands, it was determined that the components of interest in this study, contain the highest percentage of β -conformation (parallel and antiparallel) in the structure, followed by α -helices. Several shifts of the characteristic bands of rituximab obtained in the recorded spectra of conjugates are dependent on the presence of a chelator and binded metal and indicate complex formation. Radioimmunoconjugates (labeled with 555 GBq/mg ^{177}Lu) were further characterized by ITLC and SE-HPLC, with a high level of radiochemical purity and area under the peak more than 95% of the total area. Chemical and biological characterization of newly obtained immunoconjugates in *in vitro* and *in vivo* conditions for determination of important parameters for subsequent radiolabeling presents a basis for further qualification of this formulation for preclinical and clinical studies for diagnosis/treatment of lymphomas.

Key words: rituximab, *p*-Bn-SCN-DOTA, *p*-Bn-SCN-DTPA, 1B4M-DTPA, lutetium, yttrium.

СОДРЖИНА

Листа на кратенки

Апстракт

Abstract

1. ВОВЕД.....	1
2	
1.1. Лекови добиени со биотехнолошки процеси.....	12
1.2. Терапевтски пептиди.....	13
1.3. Терапевтски рекомбинантни моноклонални антитела.....	13
1.3.1. Структура и класификација на антитела.....	14
1.3.2. Основни функции на антителата.....	15
1.4. Развој на терапевтици базирани на рекомбинантни моноклонални антитела.....	16
1.4.1. Химерни рекомбинантни моноклонални антитела.....	16
1.4.2. Моноклонални антитела насочени кон канцер.....	17
1.5. Основни информации за хемијата, производството и механизмот на дејство на ритуксимаб.....	18
1.5.1. Номенклатура.....	18
1.5.2. Клиничко формулирање.....	18
1.5.3. Хемиски информации.....	18
1.5.4. Терапевтски индикации.....	19
1.5.5. Механизам на дејство.....	20
1.6. Имуноконјугати.....	21
1.7. Радиофармацевтици и радиоимуноконјугати.....	22
1.7.1. Радиоизотопи кај терапевтски радиофармацевтици.....	24
1.8. BFCA за радиообележување на биомолекули со Y-90 и лантанидни радионуклиди.....	25
1.8.1. Барања за терапевтски радиофармацевтски препарати.....	25
1.8.2. Основи на итриумската и лантанидната хемија.....	26
1.8.3. Хидролиза и преципитација.....	27
1.8.4. Термодинамичка стабилност.....	27
1.8.5. Кинетичка инертност.....	27
1.8.6. BFCA за Y-90 и лантанидни радионуклиди.....	28
1.8.7. Селективност на BFCA.....	30
1.8.8. Позиции за врзување на биомолекулите.....	30
1.8.9. Конјугирачки групи.....	30
1.8.10. Радиообележување на DTPA-BM конјугати.....	31
1.8.11. Радиообележување на DOTA-BM конјугати.....	32
1.9. Аналитички техники како алатки за карактеризација на биофармацевтици.....	32
1.9.1. Натриум додецил сулфат-полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE).....	33

1.9.1.1. Визуелизација на протеини во полиакриламидните гелови.....	34
1.9.2. Ласерска десорпција/јонизација со помош на матрица поврзана со масена спектрометрија-време на прелетување (MALDI-TOF MS).....	34
1.9.2.1. MALDI матрици, подготовка на примероци и презентирање.....	36
1.9.3. Индуктивно спрегната плазма со атомска емисиона спектроскопија (ICP-AES) и индуктивно спрегната плазма со масена спектрометрија (ICP-MS) за испитување на биофармацевтици.....	38
1.9.4. Инфрацрвена спектроскопија (IR) за испитување на биофармацевтици.....	39
1.9.5. Раманска спектроскопија за испитување на биофармацевтици.....	40
1.9.5.1. Рамански спектри и секундарна структура на протеини.....	41
1.9.5.2. Слободни сулфхидрилни и дисулфидни врски.....	42
1.9.5.3. Рамански маркери на ароматични аминокиселини.....	43
1.10. Тестирање на биолошката активност на радиофармацевтици.....	43
1.10.1. Претклинички студии за евалуација на антитуморни ефекти и нормално-токсичност.....	44
1.11. Формулација и анализа на готов радиофармацевтски препарат.....	44
1.11.1. Тестирање на стабилност на биофармацевтици.....	45
1.11.2. Рекомбинантни терапевтски протеини наспроти ниско молекуларни лекови.....	46
2. ЦЕЛ НА ИСПИТУВАЊЕТО.....	47
3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ.....	48
3.1. Материјали.....	48
3.2. Методи.....	49
3.2.1. Протоколи за подготовка на лиофилизирани формулации.....	49
3.2.1.1. Изолување на ритуксимаб од комерцијален фармацевтски препарат, MabThera®.....	49
3.2.1.2. Конјугација на ритуксимаб со трите типа на BFCA.....	50
3.2.1.3. Пречистување на имуноконјугатите со ултрафилтрација.....	50
3.2.1.4. Лيوфиланизација на добиените три типа имуноконјугати на ритуксимаб.....	50
3.2.2. Протоколи за испитување и карактеризација на лиофилизирани формулации.....	51
3.2.2.1. Определување на концентрацијата на конјугатите BFCA-ритуксимаб со BCA тест после лиофиланизација.....	51
3.2.2.2. Обележување на BFCA-ритуксимаб конјугати со нерадиоактивни изотопи на Li и Y.....	51
3.2.2.3. Испитување на лиофилизирани необележани имуноконјугати (пред и после лиофиланизација) и обележани со нерадиоактивни изотопи со SDS-PAGE електрофореза.....	51
3.2.2.4. Протеинска карактеризација на BFCA-ритуксимаб конјугатите и определување на бројот на хелатирачки групи со MALDI-TOF-MS.....	52
3.2.2.5. Определување на метали во траги во имуноконјугатите со ICP.....	53

3.2.2.6.	<i>Хемиска карактеризација и определување на секундарна структура на имуноконјугатите (необележани после лиофилизација и обележани со нерадиоактивни изотопи) со Раманска и Инфрацрвена спектроскопија.....</i>	<i>53</i>
3.2.2.7.	<i>Обележување на лиофилизираните имуноконјугати со радиоактивен Lu-177.....</i>	<i>53</i>
3.2.2.8.	<i>Определување на радиохемиската чистота на радиоимуноконјугатите со ITLC.....</i>	<i>54</i>
3.2.2.9.	<i>Определување на радиохемиската чистота на радиоимуноконјугати со SE-HPLC.....</i>	<i>54</i>
3.2.2.10.	<i>Анимални студии на нерадиоактивно Lu/Y-обележани имуноконјугати на ритуксимаб за определување на нормално-ткивната токсичност...54</i>	
4.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	56
4.1.	Определување на концентрацијата на конјугатите BFCA-ритуксимаб со BSA тест после лиофилизација.....	59
4.2.	Испитување на лиофилизираните необележани имуноконјугати (пред и после лиофилизација) и обележани со нерадиоактивни изотопи со SDS-PAGE електрофореза.....	59
4.3.	Протеинска карактеризација на BFCA-ритуксимаб конјугатите и определување на бројот на хелатирачки групи со MALDI-TOF MS.....	61
4.4.	Определување на метали во траги во имуноконјугатите со ICP.....	64
4.5.	Хемиска карактеризација и определување на секундарна структура на имуноконјугатите (необележани после лиофилизација и обележани со нерадиоактивни изотопи) со раманска и инфрацрвена спектроскопија.....	65
4.6.	Испитување на радиохемиска чистота на радиоимуноконјугатите со ITLC.....	78
4.7.	Испитување на радиохемиска чистота на радиоимуноконјугатите со SE-HPLC-хроматографија.....	82
4.8.	Анимални студии на нерадиоактивно Lu/Y-обележани имуноконјугати на ритуксимаб за определување на нормално-ткивната токсичност.....	84
5.	ЗАКЛУЧОК.....	89
6.	ЛИТЕРАТУРА.....	90
7.	ПРИЛОГ.....	102